

Evaluation of morphological traits and nitrate reductase gene expression involved in nitrogen metabolism in bread wheat roots

Zahra Mohammadzadeh

M.S. Student, Department of Biotechnology and Plant Breeding, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail address: horeyeh.1372@gmail.com

Saeid Navabpour 

*Corresponding author: Professor, Department of Biotechnology and Plant Breeding, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail address: s.navabpour@gau.ac.ir

Ahad Yamchi 

Associate Professor, Department of Biotechnology and Plant Breeding, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail address: yamchi@gau.ac.ir

Sayedeh Sanaz Ramezanzpour 

Associate Professor, Department of Biotechnology and Plant Breeding, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail address: ramezanzpours@gau.ac.ir

Abstract

Objective

Iran is located in a dry and semi-arid region, resulting in low organic matter content in its soils and, consequently, low nitrogen availability. Most plants in these areas experience nitrogen deficiency, necessitating nitrogen supplementation through chemical or organic fertilizers. This study aimed to investigate the effects of a urea fertilizer regime on the differential expression of the nitrate reductase gene and morphological traits in two wheat genotypes.

Materials and Methods

A factorial experiment was conducted using a randomized complete block design with four replications at the research farm of Alou University of Agriculture and Natural Resources, Gorgan. The experimental treatments consisted of a factorial combination of two wheat genotypes

(Morvarid and N8019 line) and two urea fertilizer regimes: (1) 150 kg per hectare, applied in three doses (50 kg at planting and 100 kg at the stem elongation stage), and (2) a control (no fertilizer). Root tissues were collected at three time points: one day and seven days after fertilizer application, and at the physiological maturity stage. Nitrate reductase gene expression was measured using the qRT-PCR technique.

Results

Urea fertilizer significantly influenced stem length, spike length, number of spikes, and number of seeds per spike, with all these traits increasing under fertilizer treatment. In the Morvarid genotype, nitrate reductase gene expression increased at all three sampling stages when treated with urea fertilizer compared to the control, with the highest increase observed one day after fertilizer application. In contrast, in the N8019 line, gene expression increased at the first sampling stage but declined in the subsequent stages.

Conclusions

The results indicate a significant difference in nitrate reductase gene expression between the two wheat genotypes in response to urea application. Urea fertilizer improved all measured agronomic traits except seed weight. The increase in seed yield was attributed to a higher number of seeds per spike. Over time, nitrate accumulation within the plant increased during the later sampling stages.

Key words: gene expression, morphological traits, nitrate reductase gene, urea fertilizer, wheat

Paper Type: Research Paper.

Citation: Mohammadzadeh, Z., Navabpour, S., Yamchi, A., & Ramezanpour, S. S. (2025). Evaluation of morphological traits and expression of nitrate reductase gene involved in nitrogen metabolism in bread wheat roots. *Agricultural Biotechnology Journal*, 17 (2), 79-106.

Agricultural Biotechnology Journal, 17 (2), 79-106. DOI: 10.22103/jab.2025.23210.1561

Received: December 30, 2024.

Received in revised form: March 17, 2025.

Accepted: March 18, 2025.

Published online: June 30, 2025.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.



© the authors

Introduction

Nitrogen deficiency has long been a major limiting factor in agricultural production, particularly in arid and semi-arid regions. Soils in these regions, including Iran, typically have low organic matter content, leading to insufficient nitrogen availability. This deficiency significantly affects plant growth and yield, necessitating the application of chemical and organic fertilizers to meet crop nitrogen demands. However, excessive use of chemical fertilizers can contribute to environmental pollution and degrade the quality of agricultural products. Therefore, understanding the mechanisms of nitrogen uptake and metabolism in plants, as well as optimizing fertilizer use, is essential for sustainable agricultural practices. The nitrate reductase (NR) gene plays a crucial role in the reduction of nitrate to nitrite, a key step in nitrogen assimilation in plants. The expression of this gene is influenced by several factors, including nitrogen availability and plant genotype. Given the fundamental role of nitrogen in plant nutrition and growth, and the specific importance of the NR gene in nitrogen metabolism, this study aims to examine the effects of different urea fertilizer regimens on the differential expression of the NR gene and morphological traits in two wheat genotypes: the Morvarid variety and the N8019 line. The primary objective of this research is to identify the genetic and physiological responses of these two wheat genotypes to different levels of urea fertilizer. Specifically, the study investigates how urea application influences wheat yield components, such as the number of grains per spike, grain weight, and other agronomic traits. Additionally, this research seeks to determine whether different urea fertilizer regimens can differentially affect NR gene expression in the two wheat genotypes, potentially leading to significant variations in morphological traits and overall plant yield. By addressing these questions, this study aims to optimize nitrogen fertilizer management strategies and identify genotypes with improved nitrogen use efficiency. The findings will contribute to a deeper understanding of nitrogen metabolism in plants and provide insights into improving wheat productivity through better fertilizer application practices.

Materials and Methods

This study was conducted as a factorial experiment using a randomized complete block design (RCBD) with four replications at the research farm of Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources. The experimental treatments consisted of a factorial combination of two wheat genotypes (Morvarid and N8019) and two urea fertilizer regimens: (1) 150 kg/ha, applied as 50 kg at planting and 100 kg at the tillering stage, and (2) a control (no fertilizer). Root tissue sampling was performed at three time points: one day and seven days after fertilizer application, and at physiological maturity. The samples were immediately placed in aluminum foil, frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C until further processing. The frozen samples

were ground in liquid nitrogen and used for RNA extraction, which was carried out using the Trizol reagent method. Nitrate reductase gene expression was quantified using the qRT-PCR technique. In addition, morphological traits including stem length, spike length, number of spikelets per spike, number of seeds per spike, and seed weight were evaluated. The collected data were analyzed using appropriate statistical software to assess treatment effects.

Results

The results indicated that urea fertilizer had a significant effect on stem length, spike length, number of spikelets per spike, and number of grains per spike. In general, plants treated with urea fertilizer exhibited an increase in these traits compared to the control. Analysis of nitrate reductase (NR) gene expression revealed that in the Morvarid genotype, NR gene expression increased at all three sampling stages following urea fertilizer application, with the highest expression observed one day after fertilization. In contrast, in the N8019 line, NR gene expression increased only at the first sampling stage but declined in the subsequent stages.

Conclusions

This study examined the effect of urea fertilizer on nitrate reductase (NR) gene expression in wheat and revealed genotype-dependent variations in response to nitrogen application. The results demonstrated a significant increase in NR gene expression in the Morvarid genotype, particularly one day after fertilization, suggesting a rapid response to nitrogen availability that may enhance metabolic processes and ultimately improve yield. Conversely, in the N8019 line, NR gene expression increased only in the early stages but declined later, potentially due to differences in gene regulation or nitrogen uptake efficiency. Urea fertilizer application positively influenced all agronomic traits, except grain weight, which is likely influenced by additional genetic and environmental factors. The increase in grain yield was primarily attributed to a higher number of grains per spike, emphasizing the critical role of optimal nitrogen use in enhancing wheat productivity. Additionally, nitrate accumulation in later sampling stages suggests efficient nitrogen uptake and retention, which could serve as an indicator of plant health and nitrogen utilization capacity. These findings contribute to strategies for optimizing nitrogen fertilizer use and improving nitrogen use efficiency (NUE) under nitrogen-deficient soil conditions. Identifying and selecting genotypes with superior nitrogen uptake and metabolism could have significant implications for wheat breeding programs, aiding in the development of varieties with enhanced nitrogen efficiency. Such advancements can play a crucial role in addressing food security challenges and promoting sustainable agriculture. Future research should further investigate the molecular mechanisms regulating NR gene expression in response to nitrogen and explore

molecular markers associated with nitrogen use efficiency. This knowledge could support plant breeding efforts and guide the development of more efficient fertilizer management strategies under diverse agronomic conditions.

Author Contributions

Zahra Mohammadzadeh conducted experiments on nitrate reductase gene expression, performed RNA extraction from wheat root samples, analyzed gene expression data, and contributed to the interpretation of results in relation to morphological traits. Saeid Navabpour was responsible for the overall research design and planning, including genotype selection and experimental protocol development. He also collected and analyzed morphological trait data and evaluated the results. Ahad Yamchi and Seyedeh Sanaz Ramezani supervised laboratory procedures, ensured compliance with scientific and safety protocols, and contributed to manuscript writing and final editing.

Data Availability Statement

Not applicable

Acknowledgements

Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources is gratefully acknowledged for financial support of the research.

Ethical Considerations

The study was approved by the Ethics Committee of the University of Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources (Ethical code: IR.UT.RES.2024.500). The authors avoided data fabrication, falsification, plagiarism, and misconduct.

Funding

This study was funded by Gorgan University of Agricultural Sciences and Resources, Iran, Grant No. 347.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

ارزیابی صفات مورفولوژیک و بیان ژن نیترات ردوکتاز دخیل در متابولیسم ازت در ریشه گندم

نان

زهرا محمد زاده

دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه بیوتکنولوژی و اصلاح نباتات، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی

گرگان، گرگان، ایران. رایانامه: horeyeh.1372@gmail.com

 **سعید نواب پور**

*نویسنده مسئول: استاد، گروه بیوتکنولوژی و اصلاح نباتات، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان،

گرگان، ایران. رایانامه: s.navabpour@gau.ac.ir

 **احد یامچی**

دانشیار، گروه بیوتکنولوژی و اصلاح نباتات، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

رایانامه: yamchi@gau.ac.ir

 **سیده ساناز رمضان پور**

دانشیار، گروه بیوتکنولوژی و اصلاح نباتات، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

رایانامه: ramezanpours@gau.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۰/۱۰ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۳/۱۲/۲۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۲/۲۸

چکیده

هدف: از آنجا که ایران در منطقه خشک و نیمه خشک قرار گرفته، مقدار مواد آلی خاک های آن پائین بوده و در نتیجه دارای سطوح پائین نیتروژن، می باشند. اغلب گیاهان در این مناطق دچار کمبود نیتروژن می باشند و بدین دلیل تأمین نیتروژن از طریق کودهای شیمیایی و آلی ضروری است به همین منظور در این پژوهش به بررسی اثرات رژیم کود اوره بر بیان افتراقی ژن نیترات ردوکتاز و صفات مورفولوژیک در دو ژنوتیپ گندم مورد بررسی قرار داده شد.

مواد و روش ها: آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک های کامل تصادفی با چهار تکرار در مزرعه تحقیقاتی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام شد. تیمارهای آزمایشی شامل ترکیب فاکتوریل دو ژنوتیپ گندم (رقم مروارید و لاین

N8019) و دو رژیم مختلف اوره (۱۵۰ کیلوگرم در هکتار، با تقسیط ۵۰ کیلوگرم در زمان کاشت، ۱۰۰ کیلوگرم در مرحله ساقه‌دهی و شاهد (بدون کود) بود. نمونه‌های بافت ریشه در سه نوبت شامل یک روز و هفت روز پس از مصرف کود و در مرحله بلوغ فیزیولوژیک جمع آوری شد. بیان ژن نیترات ردوکتاز با استفاده از تکنیک QRT-PCR اندازه‌گیری شد.

نتایج: بررسی اثر کود اوره روی طول ساقه، طول سنبله، تعداد سنبله‌چه و تعداد دانه در سنبله نشان داد که کود اوره تاثیر معنی‌داری بر تمام این صفات داشت به طوریکه با تیمار کود صفات مذکور افزایش یافتند. در این مطالعه، بیان ژن نیترات ردوکتاز در رقم مروارید تیمار شده با کود اوره نسبت به شاهد (بدون کود اوره) در هر سه مرحله نمونه‌گیری افزایش یافت به طوری که در اولین مرحله نمونه‌گیری (یک روز بعد از کود سرک) بیشترین افزایش را داشت. اما در لاین N8019 بیان ژن نیترات ردوکتاز در اولین مرحله نمونه‌گیری افزایش و در مراحل بعدی کاهش یافت.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که با استفاده از اوره در دو ژنوتیپ تفاوت معنی‌داری بر بیان ژن وجود دارد. مصرف اوره تمام صفات زراعی به جز وزن دانه را بهبود بخشیده است. افزایش عملکرد دانه به دلیل تعداد دانه بیشتر در سنبله بود. با گذشت زمان در مراحل بعدی نمونه‌گیری مقدار نیترات در داخل گیاه افزایش می‌یابد.

کلیدواژه‌ها: بیان ژن، ژن نیترات ردوکتاز، صفات مورفولوژیکی، کود اوره، گندم

نوع مقاله: پژوهشی.

استاد: محمدزاده زهرا، نواب پور سعید، یامچی احد، رمضانپور سیده ساناز (۱۴۰۴). ارزیابی صفات مورفولوژیک و بیان ژن نیترات-ردوکتاز دخیل در متابولیسم ازت در ریشه گندم نان. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۷(۲)، ۷۹-۱۰۶.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.



© the authors

مقدمه

گندم به عنوان یک محصول استراتژیک در تغذیه انسان به‌شمار می‌رود و افزایش روزافزون جمعیت جهانی مستلزم تولید بیشتر محصولات کشاورزی است (Najafi et al., 2019). تقاضا برای گندم در جهان با افزایش سریع رشد جمعیت در حال افزایش است (Hosseini et al., 2021). پیش‌بینی می‌شود که جمعیت جهان در سال ۲۰۵۰ از هشت میلیارد نفر بگذرد؛ از این رو میزان تولید این محصول هم از طریق افزایش سطح کشت و هم از طریق افزایش در واحد سطح باید افزایش یابد (Ji et al., 2017). با توجه به اهمیت گندم در الگوی غذایی کشور ایران و خسارات تنش‌های غیرزیستی بر محصولات کشاورزی، اصلاح ارقام مقاوم به تنش‌های غیرزیستی در گندم ضروری می‌باشد (Khandani et al., 2024). تنش‌های محیطی از عوامل اصلی

کاهش دهنده رشد و نمو و عملکرد گیاهان زراعی به شمار آمده و همواره امنیت غذایی انسان‌ها را تهدید می‌کند. اگر تغییرات محیطی که به‌طور طبیعی یا به‌دست انسان ایجاد شده‌اند، آنقدر وسیع باشند که روند متابولیسم گیاه را در مدت کوتاهی متوقف نماید، ابتدا اکسیداسیون غیر قابل کنترل متوقف می‌شود و سپس خسارات ناشی از تنش رخ می‌دهد. نقطه مشترک بیشتر استرس‌های بیولوژیکی و غیر بیولوژیکی در سطح سلولی تولید و تجمع رادیکال‌های فعال اکسیژن (Reactive Oxygen Species-ROS) است (Navabpour et al., 2020). از بین عناصر غذایی، ازت عامل مهمی در تولید محصول بوده، هر ساله مقدار قابل توجهی از کود نیتروژن به منظور افزایش عملکرد این محصول در سراسر جهان اعمال می‌شود. از آنجا که ایران در منطقه خشک و نیمه خشک قرار گرفته، مقدار مواد آلی خاک‌های آن پائین بوده و در نتیجه دارای سطوح پائین نیتروژن، می‌باشند. اغلب گیاهان در این مناطق دچار کمبود نیتروژن می‌باشند و بدین دلیل تأمین نیتروژن از طریق کودهای شیمیایی و آلی ضروری است (Malkuti & Khadami, 2001). نیتروژن عنصری مهم و حیاتی برای گیاه به شمار می‌رود و در پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک و کلروفیل وجود دارد و بیش از عناصر غذایی دیگر در معرض از دست رفتن می‌باشد و مقدار بازیافت آن کمتر از نصف مقدار به کار رفته می‌باشد (Boswell et al., 1995). از جمله دلایل پائین بودن راندمان جذب نیتروژن آزادسازی نیتروژن از بافت‌های گیاهی، دنیتریفیکاسیون، آبشویی و تصعید آمونیوم است. نیتروژن به عنوان مهم‌ترین عنصر غذایی در حاصل خیزی خاک، محور اصلی کودهای شیمیایی را تشکیل می‌دهد. نیتروژن در ساختمان اسید نوکلئیک، کلروفیل، آنزیم‌ها، فسفاتید و بیشتر ویتامین‌ها و سایر مولکول‌های آلی وجود دارد که در فرآیند تبادل مواد گیاهان نقش مؤثر و مهمی دارند (Beher et al., 2014). نیتروژن عمدتاً به شکل نیترات (NO_3) جذب گیاه می‌گردد. نیترات پس از جذب از طریق ریشه بوسیله آنزیم نیترات ردوکتاز سیتوپلاسمی به نیتريت تبدیل شده و سپس نیتريت به کمک آنزیم نیتريت ردوکتاز پلاستی و یا کلروپلاستی به آمونیوم تبدیل می‌شود. در نهایت آمونیوم از طریق آنزیم گلوتامین سیتنتاز به اسید آمینه گلوتامین تبدیل می‌گردد. نیترات ردوکتاز آنزیم کلیدی در چرخه متابولیسم ازت می‌باشد و آنزیمی بسیار قابل تنظیم و قابل تحریک است و در تمام سلول‌های پروکاریوتی و یوکاریوتی دیده می‌شود. یکی از اجزای کلیدی در آنزیم نیترات ردوکتاز، مولیبدن است در واقع این آنزیم، پروتئین مولیبدن دار اصلی گیاهان غیر تثبیت کننده نیتروژن محسوب می‌شود. یکی از عواقب کمبود مولیبدن، کاهش شدید فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز و در نتیجه مواجه شدن گیاه با کمبود نیتروژن است (Glaab & Kaiser, 1995). به‌علاوه، مطالعات و بررسی‌های به عمل آمده در اواخر دهه ۸۰ میلادی روشن نمود که مکانیسم‌های مولکولی در زمره مهم‌ترین فرایندهای ژنتیکی (مشمول بر همانندسازی DNA، رونویسی، ترجمه و حتی نحوه تنظیم ژن‌ها) هستند (Barazandeh et al., 2016a; Safaei et al., 2022). ماده ژنتیکی ۱ یک سلول از تعداد زیادی ژن تشکیل شده است که هیچ‌گاه همه به‌طور همزمان بیان نمی‌شوند و در هر لحظه فقط تعداد کمی از آنها بیان شده و پروتئین یا آنزیم مورد نیاز سلول را تولید می‌نمایند (Barazandeh et al., 2016b).

¹ DNA

(Mohammadabadi et al., 2023). محیطی که موجود در آن رشد می‌کند مشخص می‌کند که آیا ژن بیان شود و یا این که نیازی به فرآورده آن نیست و باید غیرفعال و یا خاموش شود (Bordbar et al., 2022; Jafari Ahmadabadi et al., 2023). ساز و کار بیان ژن اولین بار در باکتری E.coli کشف شد (Mohamadipoor et al., 2021). ژن‌های یوکاریوتی بیان‌شان تحت کنترل موقت و چندبعدی است. در هر یک از انواع بافت‌ها تنها یک مجموعه نسبتاً کوچک از تمام ژنوم بیان می‌شود و نیز بیان ژن‌ها به مرحله نمو بستگی دارد (Masoudzadeh et al., 2020; Shahsavari et al., 2023). بنابراین، بیان ژن در یوکاریوت‌ها برای هر بافت اختصاصی است. همچنین مقدار محصولات ژن که در همان بافت و نیز در سایر بافت‌هایی که آن محصول را می‌سازند، ساخته شده سبب تنظیم بیان آن ژن می‌شود (Shokri et al., 2023). یکی از اقدامات اساسی در به‌نژادی ملکولی مطالعه ژن‌ها و پروتئین‌های مرتبط با صفات مهم و مطالعه آنها در سطح سلولی یا کروموزومی است (Mohammadinejad et al., 2022; Shahsavari et al., 2023). بنابراین در دسترس بودن ابزارهای ژنومی می‌تواند اصلاح موجودات را در زمان کوتاه‌تر تا حد زیادی افزایش دهد. این ابزارها از جمله آنالیز بیان ژن برای تسهیل شناسایی ژن‌های مقاوم در حال توسعه هستند و بررسی الگوی بیان ژن‌ها و مشخص کردن ژن‌های مقاوم به بیماری در این راستا انجام می‌گیرد (Mohammadabadi et al., 2023). بررسی بیان ژن می‌تواند بررسی یک ژن خاص با استفاده از روش‌هایی مثل Real-Time PCR و یا بررسی تعداد زیادی از ژن‌ها باشد (Mohammadabadi et al., 2023). از مهم‌ترین روش‌های اندازه‌گیری میزان فعالیت ژن‌ها می‌توان به نورترن بلاتینگ، سنجش حفاظتی RNase و واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز در زمان واقعی اشاره نمود. روش اندازه‌گیری در زمان واقعی به علت حساسیت بالا و قابلیت تکرار پذیری نسبت به سایر روش‌ها ارجحیت دارد (Jafari Ahmadabadi et al., 2023). هدف اصلی در این روش، اندازه‌گیری دقیق توالی ویژه نوکلئیک اسید در یک نمونه می‌باشد (Karrou & Maranville, 2000). از آنجایی که نمی‌توان RNA را به‌عنوان الگوی اولیه در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز استفاده نمود، اولین مرحله در روش اندازه‌گیری در زمان واقعی رونویسی معکوس RNA به cDNA می‌باشد، سپس تکثیر نمایی در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، مرحله‌ی دوم این روش است (Bustin, 2000). در همین راستا این تحقیق به‌منظور ارزیابی الگوی بیان ژن نیترات ردوکتاز و همچنین اندازه‌گیری صفات مورفولوژیک در ریشه گندم نان ش که به‌عنوان شاخص‌های تحمل به تنش شناخته می‌شوند در دو ژنوتیپ گندم (مروارید، N8019) جهت بررسی تحمل آن‌ها نسبت به سمیت فلز جیوه انجام شد.

مواد و روش‌ها

آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با چهار تکرار در مزرعه تحقیقاتی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان با عرض جغرافیایی ۳۶ درجه ۴۹ دقیقه شمالی، طول جغرافیایی ۵۴ درجه و ۱۹ دقیقه شرقی و ارتفاع ۱۲ متر از سطح دریا انجام شد. تیمارهای آزمایش شامل دو ژنوتیپ، رقم مروارید و لاین N8019 و دو رژیم متفاوت کود اوره شامل ۱۵۰

کیلوگرم در هکتار، با تقسیط ۵۰ کیلوگرم در زمان کاشت و ۱۰۰ کیلوگرم در مرحله ساقه دهی، و شاهد (بدون تیمار کود). نمونه‌گیری از خاک مزرعه برای تعیین نیتрат محلول قابل جذب انجام شد.



شکل ۱. نمایی از زمین کشت شده در مزرعه تحقیقاتی

Figure 1. A view of the cultivated land in the research farm

نمونه برداری برای صفات مورفولوژیکی: پس از رسیدن گیاهان به مرحله رشدی رسیدگی کامل برای اندازه گیری صفات طول ساقه، طول خوشه، تعداد سنبلیچه، تعداد دانه در سنبله، وزن هزار دانه، وزن خشک اندام های هوایی، وزن خشک ریشه و طول ریشه، از هر واحد آزمایشی با حذف حاشیه‌ها به طور تصادفی از هر کرت ۱۰ بوته برداشت گردید. نمونه برداری ریشه با استفاده از آگر (ابزاری برای نمونه برداری از خاک در عمق زیادتر) انجام شد. متداولترین نوع آگر مورد استفاده دارای لوله سیلندری به ارتفاع ۱۵ سانتی متر و با قطر داخلی ۷ سانتی متر است. برای تهیه نمونه ابتدا بخش هوایی گیاه از طوقه قطع گردید. بعد لوله نمونه برداری را روی طوقه قرار داده و با ضربه لوله تا عمق ۳۰ سانتیمتر خاک فرو برده شد. بدین ترتیب ریشه گیاه با خاک مربوطه به بیرون انتقال داده و پس از شستشو، ریشه‌ها را داخل پاکت گذاشته و برای اندازه‌گیری‌های بعدی به آزمایشگاه انتقال داده شد. طول ریشه را با روش Newman (Newman, 1966) تخمین زده شد. روش کار بدین ترتیب بود که تعداد برخوردهای ریشه‌ها با یک سری خطوط عمودی و افقی شمارش شده و سپس با کمک تعداد برخوردها، طول ریشه تخمین زده می شود. بدین منظور از یک ظرف شیشه‌ای که زیر آن یک کاغذ شطرنجی قرار گرفته بود استفاده شد. برای پخش بهتر ریشه‌ها در داخل ظرف مقداری آب ریخته و ریشه‌ها داخل آب پراکنده شدند پس از پخش یکنواخت ریشه‌ها در داخل ظرف، تعداد برخوردها با خطوط عمودی و افقی شمارش و یادداشت شدند (N). سپس طول ریشه (I) با استفاده از رابطه زیر بدست آمد.

$$I=0.786 N$$

نمونه های برداشت شده برای تعیین وزن خشک، در آون ۷۰ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸ ساعت قرار گرفتند. به منظور استخراج RNA نمونه گیری از بافت ریشه در سه مرحله شامل: یک روز پس از کود سرک، هفت روز پس از کود سرک و زمان رسیدگی فیزیولوژیک انجام شد. نمونه ها در داخل فویل آلومینیومی قرار گرفت و بلافاصله در نیتروژن مایع منجمد و در فریزر -۸۰ درجه سانتی‌گراد تا زمان استخراج RNA نگهداری شدند. این نمونه‌ها درون نیتروژن مایع پودر شدند و از آن‌ها برای

استخراج استفاده گردید. RNA به وسیله بافر استخراج تریازول استخراج گردید. سپس سنتز cdNA با روش پیشنهادی شرکت فرمنتاز صورت گرفت و به وسیله آغازگرهای ژن خانه دار GAPDH با استفاده از PCR، cdNA سنتز شده آزمون گردید. جهت ارزیابی الگوی تظاهر ژن نیتراژ ردوکتاز از دستگاه iQ5 شرکت Bio Rad و کیت سایر بیوپارس (دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان) که قادر است ارزیابی را در زمان واقعی انجام دهد استفاده شد. به منظور نرمال سازی داده ها از ژن خانه دار GAPDH که دارای بیان یکسانی در تمام تیمارها است استفاده شد. آغازگرهای مورد نیاز بر اساس اطلاعات موجود در سایت NCBI و با استفاده از نرم افزار پرایمر ۳ و در نظر گرفتن خصوصیات مطلوب برای استفاده در روش QRT-PCR طراحی شدند. از آنجایی که طول توالی محصولات بین ۱۳۲ و ۱۸۷ باز بود، دمای نقطه ذوب بین ۵۱/۴ تا ۶۰ درجه سانتی گراد، با توجه به درصد GC و طول باندها انتخاب شد. اطلاعات مربوط به آغازگرها در جدول شماره ۱ آورده شده است. در پایان واکنش اطلاعات به نرم افزار REST منتقل شده و تجزیه داده ها انجام گرفت (Moloudi et al., 2013). RNA به وسیله بافر استخراج تریازول استخراج گردید و کیفیت آن با قرار دادن نمونه ۲ میکرولیتری از محصول استخراج روی ژل آگارز ۱/۵٪ و رنگ آمیزی با سیف دای و ران شدن و مشاهده باندهای ۱۸S و ۲۸S تایید شد. برای بررسی کمی میزان استخراج، از اسپکتروفتومتر استفاده شد. مقدار جذب نوری در طول موج های ۲۶۰، ۲۸۰ و ۳۲۰ نانومتر توسط دستگاه خوانده شد و مقدار کل RNA برحسب میکروگرم در میکرولیتر و میزان خلوص آن نیز (معادله ۱) محاسبه گردید. در آزمایش غلظت سنجی RNA، نسبت بدست آمده در محدوده ۱/۸ تا ۲ بود که نشان دهنده درجه خلوص قابل قبول RNA بود

$$RNA = \frac{(OD_{260} - OD_{320}) \times 40 \times 100}{1000} \quad \text{(معادله ۱)}$$

$$Yield = \frac{OD_{(260-320)}}{OD_{(280-320)}} \quad \text{(معادله ۲)}$$

نتایج و بحث

نتایج بررسی صفات مورفولوژی: تجزیه واریانس داده ها (جدول ۲) نشان داد که سطوح کود ازت برای صفات طول ساقه، طول سنبله، تعداد سنبله، تعداد دانه در سنبله، وزن خوشه، وزن خشک اندام هوایی، طول ریشه، وزن خشک ریشه اختلاف معنی داری داشت. همچنین ژنوتیپ نیز از نظر آماری برای صفات طول ساقه، طول سنبله، تعداد سنبله و وزن هزاردانه اختلاف معنی داری نشان داد. اثر متقابل کود ازت × رقم برای صفت وزن هزار دانه و طول ریشه معنی دار بود. این بدین معنی است که روند تغییرات صفات مزبور در ژنوتیپ های مورد مطالعه عکس العمل متفاوتی را تحت تاثیر سطوح کود اوره نشان داد. نتایج بعضی پژوهش های انجام گرفته نشان داده است که مصرف کود اوره در مراحل مختلف رشد گندم توانسته است عملکرد دانه، تعداد دانه در سنبله، عملکرد بیولوژیک، شاخص برداشت، مقدار پروتئین، کیفیت نانوائی و راندمان استفاده از نیتروژن را افزایش دهد.

جدول ۱. توالی آغازگرهای ژنهای نیتрат ردوکتاز و GAPDH مورد استفاده در آزمایش QRT-PCR

Table 1. Primer sequence of nitrate reductase and GAPDH genes used in QRT-PCR test

نام آغازگر	نوکلیوتید شروع	پایان نوکلیوتید	توالی آغازگر	دمای ذوب (C°)	طول محصول واکنش	شماره دسترسی در پایگاه NCBI
Initiator name	start nucleotide	end nucleotide	Primer sequence	Melting temperature (C°)	The length of the reaction product	Accession number in NCBI database
<i>NR For</i>	48	66	5'-CAA GGA GTC GGC GTG GAT-3'	66	101bp	AAA96249.1
<i>NR Rev</i>	148	170	5'-CGG CGT TAA TAA GGA TGC TGT C-3'	65.8		
<i>GAPDH For</i>	113	132	5'-TCA CCA CCG ACT ACA TGA CC-3'	60	121 bp	EF592180
<i>GAPDH Rev</i>	233	214	5'-ACA GCA ACC TCC TTC TCA CC-3'	60		

طول ساقه: بر اساس نتایج جدول میانگین مربعات تأثیر فاکتور ژنوتیپ و کود اوره به تنهایی بر طول ساقه در سطح آماری

۵ درصد معنی دار بوده است (جدول ۲). در مقایسه میانگین بیشترین طول ساقه با میانگین ۹۶/۶۵ سانتی متر در رقم مروارید تیمار شده با کود اوره و کمترین مقدار طول ساقه با میانگین ۷۴/۹۶ سانتی متر در لاین N8019 در شرایط بدون افزودن کود اوره (شاهد) به دست آمد (شکل ۲). ارقام به لحاظ ژنتیکی دارای طول ساقه متفاوتی می باشند که می تواند یکی از دلایل عمده بیشتر بودن طول ساقه در رقم مروارید نسبت به لاین N8019 باشد. نتایج بدست آمده با گزارش Mosanaei et al. (2017) مطابقت دارد.

طول سنبله: نتایج جدول تجزیه واریانس نشان می دهد که اثر رقم و اثر کود اوره به تنهایی بر طول سنبله در سطح یک

درصد معنی دار بود (جدول ۲). بیشترین طول سنبله با میانگین ۱۰/۴۵ سانتی متر در لاین N8019 تیمار شده با کود اوره و کمترین مقدار طول سنبله با میانگین ۴/۲۸ سانتی متر در رقم مروارید بدون تیمار با کود اوره (شاهد) بدست آمد (شکل ۳). با مصرف مقادیر مختلف کود اوره در گندم در شرایط آب و هوایی گرگان Souqhi et al. (2018) گزارش کردند، مقادیر مختلف کود ازت موجب افزایش معنی دار طول سنبله و در نتیجه آن تعداد دانه در سنبله گردید.

جدول ۲. تجزیه واریانس صفات مورد بررسی به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک کامل تصادفی

Table 2. Variance analysis of investigated traits factorially in the form of randomized complete block design

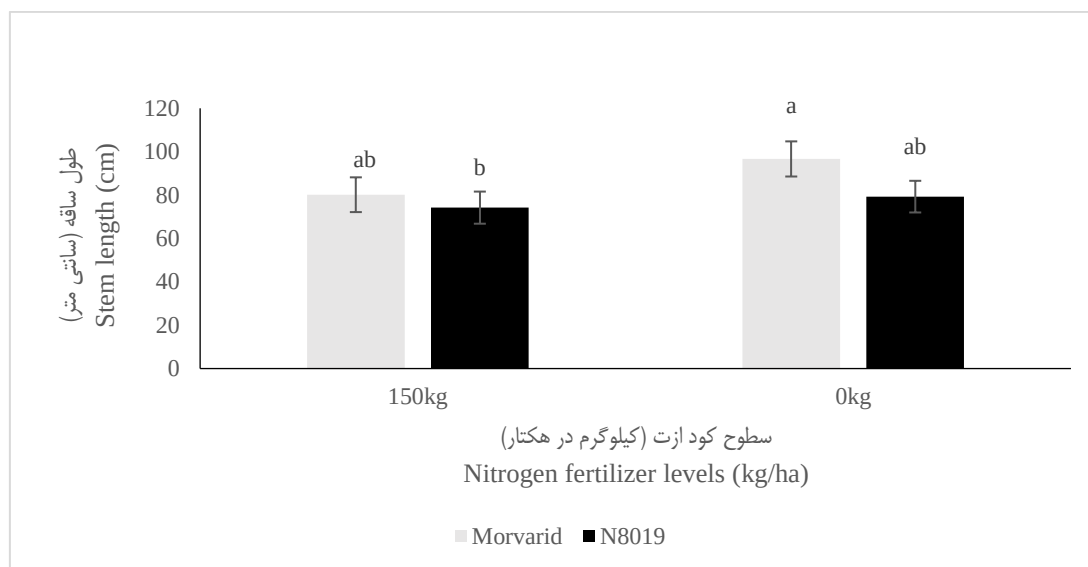
میانگین مربعات average of squares							درجه آزادی df	منابع تغییر Sources Change
طول ریشه root length	وزن خشک Dry weight of aerial parts	وزن هزار دانه the weight of one thousand seeds	تعداد دانه در سنبله Number of seeds per spike	تعداد سنبلچه The number of spikes	طول سنبله spike length	طول ساقه stem length		
19.4**	0.515**	7.31 ^{ns}	28.11 ^{ns}	0.591 ^{ns}	1.17 ^{ns}	97.4 ^{ns}	3	بلوک Block
21.16**	7.33**	165.1*	906.1**	51.12**	22.7**	465.1*	1	کود اوره Urea fertilizer
0.21 ^{ns}	0.079 ^{ns}	178.2**	0.062**	34.22*	63.1**	544.7*	1	ژنوتیپ Genotype
3.61*	0.063 ^{ns}	125.4*	2.89 ^{ns}	0.202 ^{ns}	1.6 ^{ns}	130 ^{ns}	1	کود اوره × ژنوتیپ Urea fertilizer × genotype
0.681	0.069	16.43	51.6	3.65	1.53	82.9	6	خطا error
8.04	13.04	9.96	24.20	13.9	17.3	11.1	–	درصد ضریب تغییرات CV

ns, * و ** به ترتیب غیرمعنی دار و معنی دار در سطوح آماری ۵ و ۱ درصد

ns, * and ** are non-significant and significant at statistical levels of 5 and 1 percent, respectively

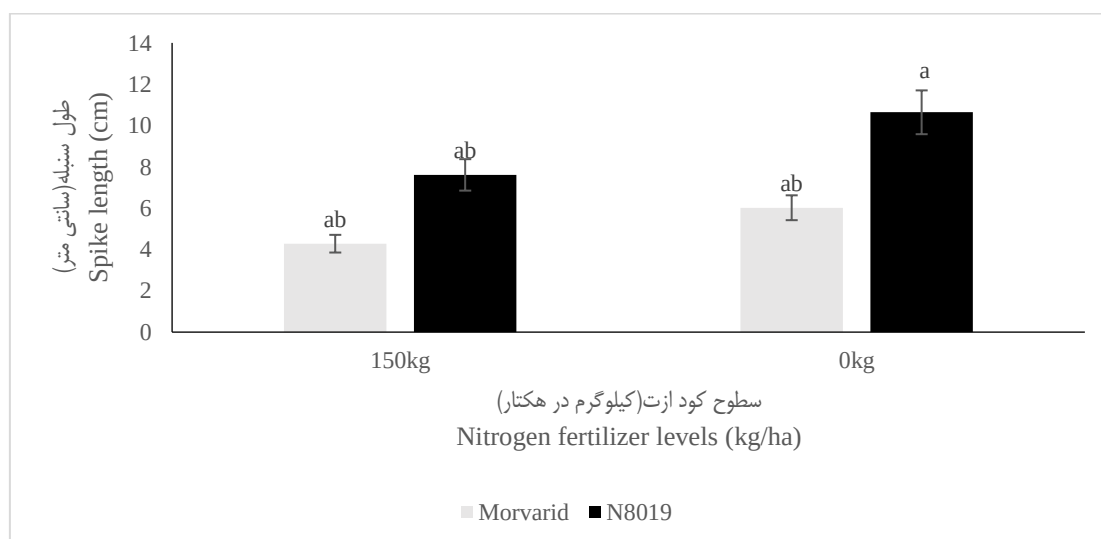
تعداد سنبلچه: همانطور که در جدول (۲) ملاحظه می شود اثر کود اوره بر تعداد سنبلچه در سطح ۵ درصد و اثر رقم بر تعداد سنبلچه در سطح ۱ درصد معنی دار شده است. با مصرف کود اوره تعداد سنبلچه در هر دو رقم افزایش یافت اما بیشترین تعداد سنبلچه با تعداد ۱۶ عدد در رقم مروارید تیمار شده با کود اوره و کمترین تعداد سنبلچه در لاین N8019 بدون تیمار کود اوره (شاهد) بدست آمد (شکل ۴).

تعداد دانه در سنبله: بررسی جدول تجزیه واریانس ۲ نشان می دهد که تاثیر کود اوره بر صفت تعداد دانه در سنبله در سطح آماری یک درصد معنی دار و اثر رقم بر صفت مذکور معنی دار نمی باشد. با مصرف کود اوره تعداد دانه در سنبله در هر دو رقم افزایش یافت اما بیشترین تعداد دانه در سنبله در رقم مروارید تیمار شده با کود اوره با ۳۶/۷۷ دانه در سنبله و کمترین آن در رقم مروارید بدون تیمار با کود اوره با ۲۰/۸۷ دانه در سنبله بود (شکل ۵). در پژوهشی Cassman et al. (1992) با کاربرد مقادیر مختلف مصرف کود ازت مشاهده شد که تعداد دانه در سنبله و تعداد سنبله در متر مربع به تناسب افزایش مصرف نیتروژن افزایش یافت.



شکل ۲. تغییرات طول ساقه در دو رقم مروارید و N8019

Figure 2. Changes in stem length in two cultivars, morvarid and N8019

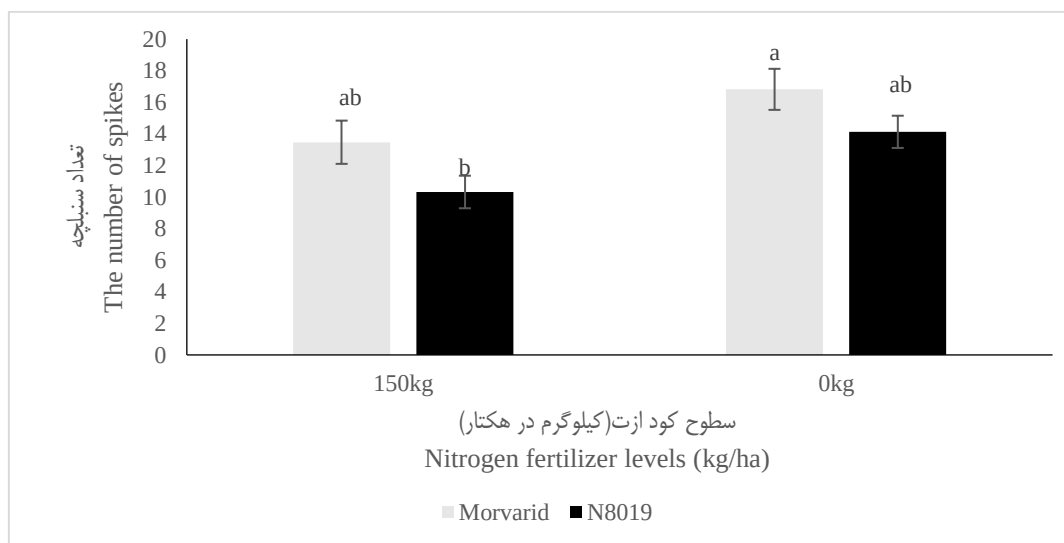


شکل ۳. تغییرات طول سنبله در دو رقم مروارید و N8019

Figure 3. Spike length changes in two cultivars, morvarid and N8019

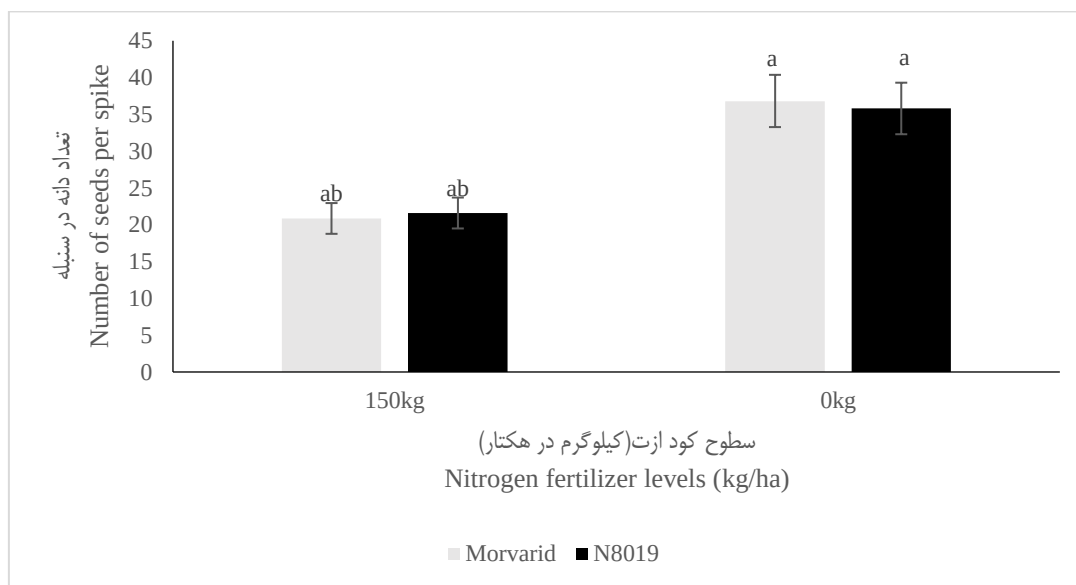
در پژوهشی (Noori et al. 2014) گزارش کردند که سطوح مختلف نیتروژن و قارچ میکوریزا باعث افزایش تعداد دانه در سنبله و عملکرد دانه شد که با نتایج این تحقیق مطابقت داشت. با بررسی اثر سطوح مختلف نیتروژن و روی بر عملکرد و اجزای عملکرد گندم رقم چمران در شرایط تنش گرمای آخر فصل در اهواز گزارش دادند که بیشترین تعداد دانه در متر مربع (۲۷۴۱۰) در تاریخ کاشت بهینه اول آذر و مصارف ۲۲۵ و ۲۰ کیلوگرم در هکتار نیتروژن و روی حاصل شد در حالی که کمتر این مقدار این صفت

(۵۴۹۵) در تاریخ کاشت آخر و عدم مصرف نیتروژن و روی (شاهد) به دست آمد. با افزایش مصرف نیتروژن، تعداد دانه در واحد سطح ۵۲ درصد افزایش یافت (Mosavian et al., 2020).



شکل ۴. تغییرات تعداد سنبلچه در دو رقم مروارید و N8019

Figure 4. Changes in the number of spikelets in two cultivars, morvarid and N8019



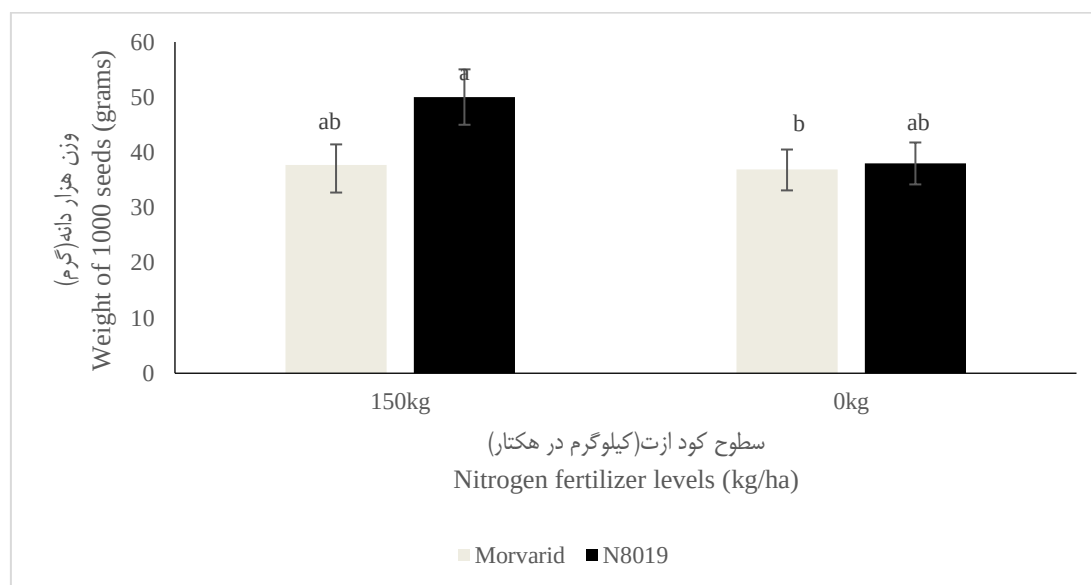
شکل ۵. تغییرات تعداد دانه در سنبله در دو رقم مروارید و N8019

Figure 5 . Changes in the number of seeds per spike in two cultivars, morvarid and N8019

وزن هزار دانه: بررسی اثر تیمار ها نشان داد که فاکتور رقم در سطح آماری یک درصد معنی دار بوده و فاکتور کود اوره و

اثر متقابل کود اوره و رقم در سطح آماری ۵ درصد تأثیر معنی داری بر وزن هزار دانه گندم داشت (جدول ۲). با مصرف کود اوره

وزن هزار دانه در هر دو رقم کاهش یافت. بیشترین وزن هزاردانه در لاین N8019 بدون تیمار با کود اوره با میانگین ۵۰ گرم و کمترین وزن هزاردانه در رقم مروارید تیمار شده با کود اوره با میانگین ۳۶ گرم بدست آمد (شکل ۶). در پژوهش (Millner 2005) et al. نیز با کاربرد نیتروژن در مرحله ظهور برگ پرچم مشاهده شد که کاربرد نیتروژن در این مرحله باعث کاهش وزن هزار دانه می شود.



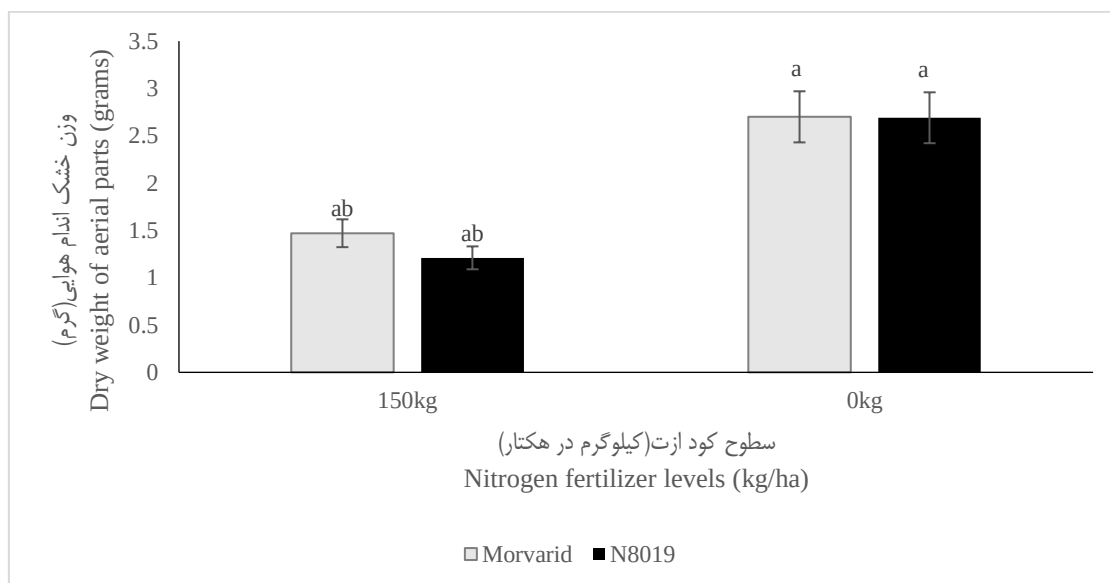
شکل ۶. تغییرات وزن هزار دانه در دو رقم مروارید و N8019

Figure 6. Changes in the weight of 1000 seeds in two cultivars, morvarid and N8019

وزن خشک اندام هوایی: بر اساس نتایج جدول میانگین مربعات تأثیر فاکتور کود اوره بر وزن خشک اندام هوایی در سطح آماری ۱ درصد معنی دار و تأثیر رقم و اثر متقابل رقم در کود اوره برای وزن خشک اندام هوایی معنی دار نیست (جدول ۲) با مصرف کود اوره وزن خشک اندام هوایی در هر دو رقم افزایش یافت. مصرف کود اوره موجب افزایش سطح برگ، تشکیل و بقای پنجه و دوام سایه انداز (شاخص سطح برگ و دوام سطح برگ) میشود و این افزایش به نوبه خود منجر به تولید مقادیر بیشتر ماده خشک و عملکرد بالا می گردد (Banzige, 2003).

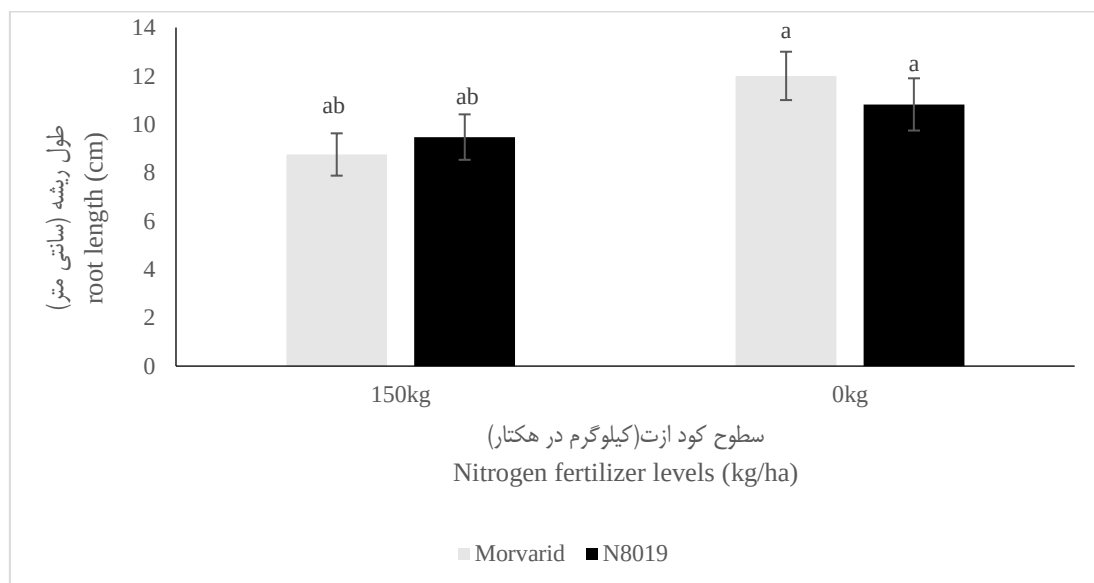
طول ریشه: میانگین مربعات طول ریشه در ارقام مورد مطالعه، اختلاف معنی داری در سطوح مختلف کود اوره نشان داد (جدول ۲). نتایج این آزمایش نشان داد طول ریشه گندم در قسمتی از خاک که کود نیتروژن اضافه شده بود افزایش یافت (شکل ۸). در پژوهش Karrou & Maranville (1994) پاسخ واریته های گندم به ازت و رژیم های رطوبتی مختلف خاک را بررسی و به این نتیجه رسیدند که اثر نیتروژن بر رشد ریشه ممکن است مثبت یا منفی باشد که این بستگی به غلظت آن در سطح ریشه دارد اگر مقدار کافی به کار رود رشد ریشه تحریک خواهد شد و هر چه سطح نیتروژن زیادتر از آستانه مطلوب باشد رشد ریشه کاهش می یابد.

آنها همچنین دریافتند که کمبود نیتروژن موجب کاهش رشد اندام‌های هوایی نیز می‌گردد. نتایج (Jirayi et al. 2013) و (2015) Sanvand & Sayah Far با نتایج این پژوهش مطابقت داشت.



شکل ۷. تغییرات وزن خشک اندام‌های هوایی در دو رقم مروارید و N8019

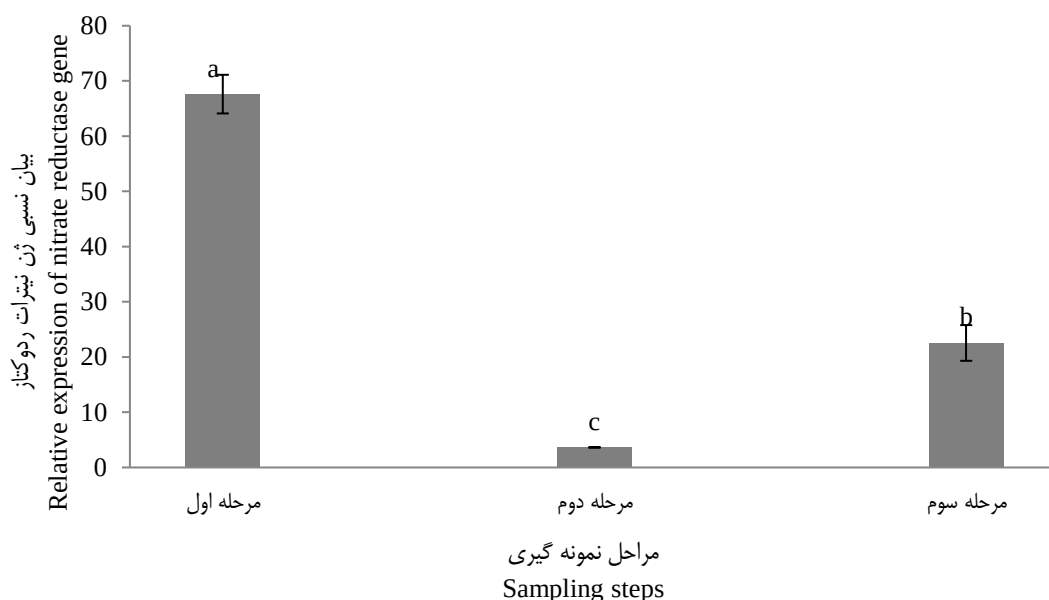
Figure 7. Changes in dry weight of aerial parts in two cultivars, morvarid and N8019



شکل ۸. تغییرات طول ریشه در دو رقم مروارید و لاین N8019

Figure 8. Root length changes in two cultivars of morvarid and line N8019

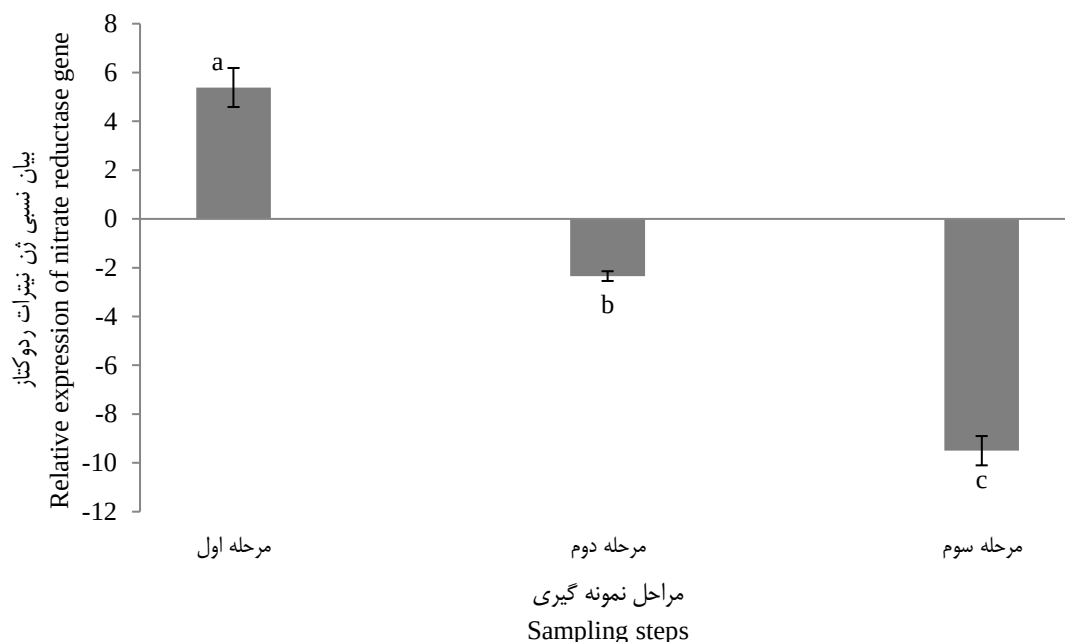
نتایج حاصل از ارزیابی الگوی بیان ژن نیترات ردوکتاز: نیترات موجود در خاک بوسیله سلول های ریشه جذب و منتقل می شود، و زمانی که مقدار نیترات کم باشد در واکوئل سلول های ریشه ذخیره می شود. در مقادیر بالا نیترات اضافی به برگ ها منتقل شده و در سلول های واکوئل برگ ذخیره می شود. بنابراین جذب و تجمع نیترات به شدت وابسته به نیترات درونی گیاه است (Chen et al., 2004). نیترات به طور مستقیم بر فعالیت نیترات ردوکتاز اثر دارد. زمانی که غلظت نیترات داخلی گیاه کم باشد، با عرضه نیترات فعالیت نیترات ردوکتاز افزایش می یابد، و زمانی که میزان نیترات داخلی بالا رود، فعالیت نیترات ردوکتاز شروع به کاهش می کند (Vidal et al., 2010) فعالیت نیترات ردوکتاز به عنوان یک عامل محدود کننده برای جذب نیترات در گیاهان عالی، مطرح است. الگوی بیان ژن نیترات ردوکتاز در پاسخ به کود اوره نشان داد، در رقم مروارید، در هر سه مرحله نمونه گیری افزایش معنی داری داشت (شکل ۹).



شکل ۹. روند تغییرات بیان ژن نیترات ردوکتاز در رقم مروارید تیمار شده با ۱۵۰ کیلوگرم کود اوره در مرحله ساقه دهی در مقایسه با رقم مروارید بدون کود اوره (شاهد). مرحله اول: یک روز پس از کود سرک مرحله دوم: هفت روز پس از کود سرک مرحله سوم: رسیدگی فیزیولوژیک

Figure 9. The trend of nitrate reductase gene expression changes in the pearl variety treated with 150 kg of urea fertilizer at the stemming stage compared to the morvarid variety without urea fertilizer (control). The first stage: one day after the fertilizer, the second stage: seven days after the fertilizer, the third stage: physiological treatment

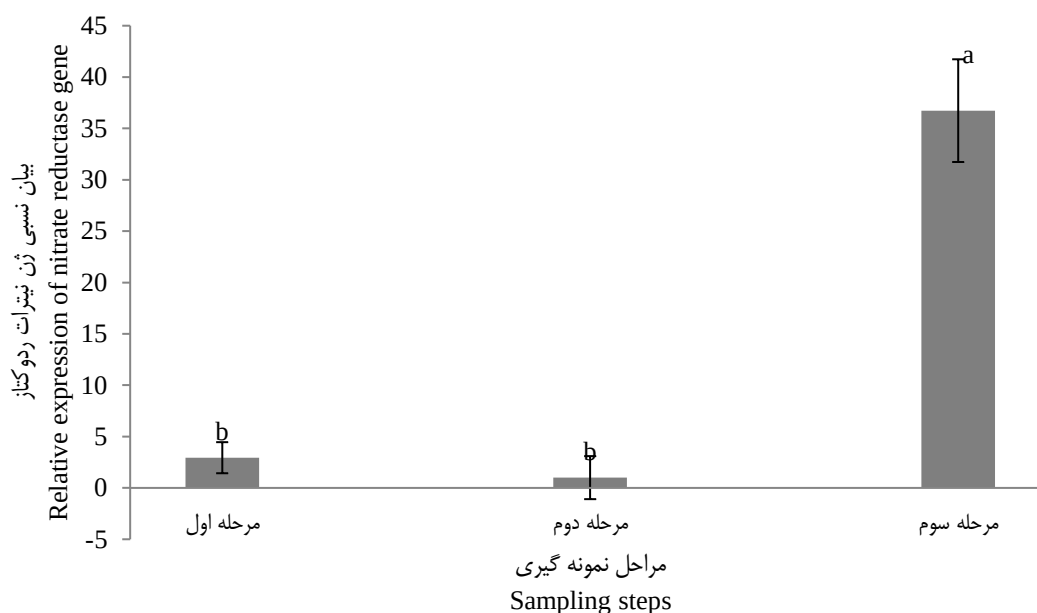
میزان بیان این ژن در مرحله اول نمونه گیری (یک روز بعد از کود سرک) بیشترین افزایش را داشت، و با گذشت زمان در مراحل نمونه گیری بعدی کاهش یافت، بیشترین کاهش در مرحله دوم نمونه گیری مشاهده شد. که با نتایج (Reda et al., 2011) مطابقت داشت. این موضوع به این دلیل است که فعالیت نیترات ردوکتاز در pH پایین افزایش می یابد زیرا پروتئین کینازها بیشتر از پروتئین فسفاتازها تحت تاثیر اسیدی شدن قرار می گیرند و باعث می شود نیترات ردوکتاز غیر فسفریله شود و پروتئین ۳-۳-۱۴ از نیترات ردوکتاز جدا شود (Yang et al., 2010). بیان ژن NR در لاین N8019 تیمار شده با کود اوره نسبت به شاهد (بدون کود اوره) (شکل ۱۰) در مرحله اول نمونه گیری بیان ژن افزایش اما در مراحل بعدی نمونه گیری روند کاهشی نشان داد. (1991) Faure et al. مشاهده کردند، تنها در زمانی که نیترات داخلی گیاه پایین تر باشد، نیترات اثر مثبت بر فعالیت نیترات ردوکتاز داشته، در حالی که وقتی نیترات داخلی بالاتر رود، فعالیت نیترات ردوکتاز به صورت قابل ملاحظه ای کاهش یافت. نیترات در غلظت های پایین به شدت باعث تحریک رونویسی از ژن نیترات ردوکتاز می شود که در نهایت منجر به افزایش تولید نیتريت می شود.



شکل ۱۰. روند تغییرات بیان ژن نیترات ردوکتاز در لاین N8019 تیمار شده با ۱۵۰ کیلوگرم کود اوره در مرحله ساقه دهی در مقایسه با رقم مروارید بدون کود اوره (شاهد). مرحله اول: یک روز پس از کود سرک، مرحله دوم: هفت روز پس از کود سرک، مرحله سوم: رسیدگی فیزیولوژیک

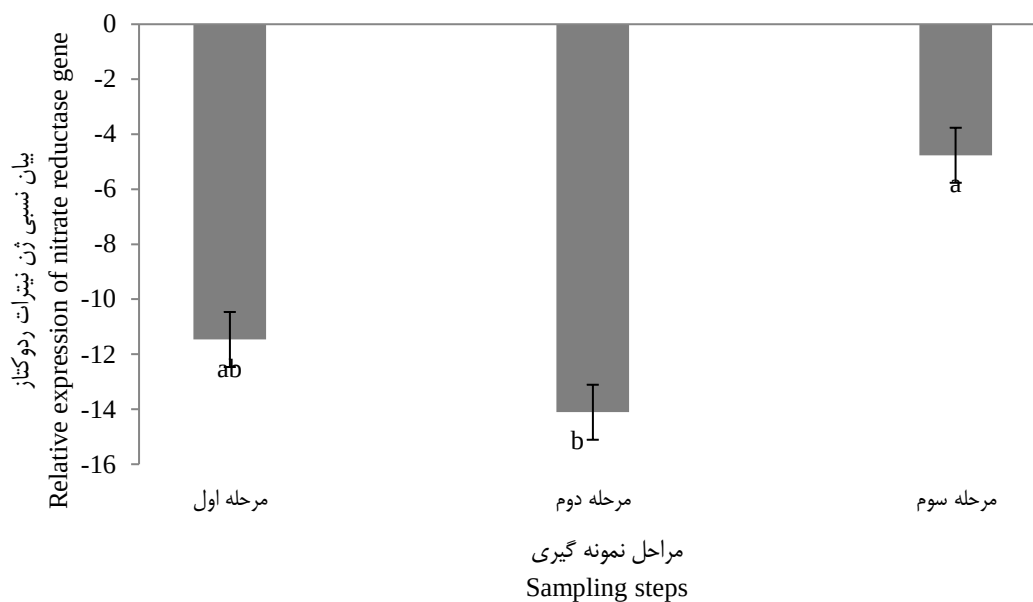
Figure 10. The trend of nitrate reductase gene expression changes in N8019 line treated with 150 kg of urea fertilizer at the stemming stage compared to the morvarid variety without urea fertilizer (control). The first stage: one day after the vinegar fertilizer, the second stage: seven days after the vinegar fertilizer, the third stage: physiological treatment

در مطالعه‌ای (Yang et al., 2010) فعالیت نیتрат ردوکتاز در ریشه و برگ‌های خیار تیمار شده با ۱۴۰ میلی مول نیترات در طول دوره تیمار افزایش یافت. نشان داده شد که فعالیت نیترات ردوکتاز به مدت کوتاه تحت تاثیر تنش نیترات قرار گرفت. با گذشت زمان فعالیت نیترات ردوکتاز کاهش یافت. این نشان می‌دهد که نیترات در دراز مدت اثر منفی بر روی فعالیت نیترات ردوکتاز دارد. این نتایج نشان می‌دهند که فعالیت نیترات ردوکتاز تنها بوسیله سطح mRNA نیترات ردوکتاز کنترل نمی‌شود بلکه به تغییرات محیطی هم پاسخ می‌دهد (LaBrie & Crawford, 1994). در الگوی تظاهر بیان ژن نیترات ردوکتاز در رقم مروارید تیمار شده با کود ازت در مقایسه با لاین N8019 تیمار شده (شکل ۱۱) مشاهده شد، بیان ژن در هر سه مرحله نمونه گیری افزایش یافت بیشترین افزایش در مرحله رسیدگی فیزیولوژیک وجود داشت، و اختلاف معنی داری در بیان ژن در این سه مرحله دیده شد. بیان ژن نیترات ردوکتاز (شکل ۱۲) در رقم مروارید شاهد (بدون افزودن کود اوره) در مقایسه با رقم لاین N8019 شاهد (بدون افزودن کود اوره)، کاهش معنی داری در هر سه مرحله نمونه گیری نشان داد.



شکل ۱۱. روند تغییرات بیان ژن NR در رقم مروارید در مقایسه با لاین N8019 در شرایط افزودن ۱۵۰ کیلوگرم کود اوره

Figure 11. Changes in the expression of the NR gene in the morvarid variety compared to the N8019 line in the condition of adding 150 kg of urea fertilizer



شکل ۱۲. روند تغییرات بیان ژن NR در رقم مروارید در مقایسه با لاین N8019 بدون افزودن کود اوره

Figure 12. The trend of NR gene expression changes in morvarid variety compared to N8019 line without adding urea fertilizer

تیمار گندم با اوره باعث افزایش قابل توجهی در بیان ژن نیتрат ردوکتاز ریشه و برگ شد اگرچه بیان ژن در ریشه نسبت به شاخسار بیشتر بود. به دلیل افزایش جذب نیترات از خاک فعالیت NR تحریک شد (Leleu & Vulysteker, 2004). در پژوهشی Saroop et al. (2000) این افزایش فعالیت NR را ناشی از اثر غیر مستقیم نور گزارش کردند. این مسئله تأیید شده است که فعالیت NR در گندم بستگی به شرایط نور، حضور نیترات در مراحل رشد دارد و بوسیله کوفاکتور مولیبدن و فسفوریلاسیون تنظیم می شود. همچنین حضور کاتیون Mg^{2+} برای تنظیم فعالیت NR در سطح فسفوریلاسیون لازم است (Galeeva et al., 2012). در پژوهش Huber et al. (1992) مشاهده شد فعالیت نیترات ردوکتاز در برگ اسفناج در اثر اضافه کردن نمک های آلی و معدنی به عصاره حاوی آنزیم افزایش یافت، تصور بر این بود که تحریک NR ناشی از اثر بالای یون های ناشی از نمک بوده است، به دلیل اینکه نمک ها اثر پروتئین فسفاتازها را مهار می کنند و NR فسفوریله نمی شود بلکه دفسفوریلاسیون رخ می دهد و در ادامه پروتئین ۳-۳-۱۴ از NR جدا می شود و در نهایت فعالیت ژن نیترات ردوکتاز افزایش می یابد. نتایج این پژوهش مبنی بر تفاوت بیان این ژن در ارقام مختلف با نتایج Duan et al. (2016) مطابقت داشت.

بحث

بررسی ها نشان داد که سطوح کود ازت برای صفات طول ساقه، طول سنبله، تعداد سنبلچه، تعداد دانه در سنبله، وزن خوشه، وزن خشک اندام هوایی، طول ریشه، وزن خشک ریشه اختلاف معنی داری داشت، با مصرف کود اوره رشد تمام اندام های رویشی

گیاه افزایش می‌یابد. مقادیر مختلف کود ازت موجب افزایش معنی دار طول سنبله شد، به نظر می‌رسد کاربرد کود نیتروژن در گرگان بیشتر از طریق افزایش تعداد دانه در سنبله باعث افزایش عملکرد دانه می‌شود چون با افزایش میزان کود نیتروژن طول سنبله به طور معنی دار افزایش یافت. با مصرف کود اوره تعداد سنبلچه در هر دو رقم افزایش یافت، با توجه به اینکه مرحله ظهور برجستگی دوگانه ۱ و مرحله ظهور سنبلچه انتهایی مهم‌ترین مراحل در تعیین تعداد سنبلچه در سنبله می‌باشند بنابراین، فراهمی نیتروژن در این مراحل منجر به تعداد سنبلچه بیشتری خواهد شد. با مصرف کود اوره تعداد دانه در سنبله در هر دو رقم افزایش یافت به نظر می‌رسد که افزایش عملکرد ناشی از افزایش مصرف نیتروژن بعثت افزایش در اجزاء متشکله آن بخصوص تعداد سنبله بارور در متر مربع بوده است. بطور کلی تیمار نیتروژن با تاثیر بر روی هر یک از اجزاء عملکرد باعث افزایش در عملکرد دانه گردید. تاثیر مثبت مصرف کود ازته تا یک حد معین، بر عملکرد دانه در بسیاری از آزمایش‌ها مشاهده شده است. افزایش عملکرد دانه ناشی از سطوح بالای ازت، عمدتاً مربوط به افزایش عملکرد بیولوژیک و تعداد دانه در مترمربع (تعداد سنبله در متر مربع، تعداد دانه در سنبله) است دیگر پژوهشگران نیز نتایج مشابهی را گزارش نموده‌اند (Ayoub et al., 1994) با مصرف کود اوره وزن هزار دانه در هر دو رقم کاهش یافت. وزن هزار دانه با افزایش مقادیر کود نیتروژن نیز کاهش می‌یابد. کاهش در وزن هزار دانه به علت افزایش تعداد پنبه‌ها و افزایش تراکم بوته‌ها بود. همچنین با مصرف کود اوره وزن خشک اندام هوایی در هر دو رقم افزایش یافت. همچنین در بررسی اثر تقسیط کود نیتروژن و نحوه واکنش ارقام گندم دوروم مشخص شده که تقسیط نیتروژن موجب کاهش سطح برگ پرچم و عملکرد ماده خشک می‌شود. کاهش ماده خشک در پایان فصل رشد در نتیجه منفی شدن شاخص‌های رشد به علت سایه اندازی و وجود برگ‌های پیر و همچنین فتوستتوز خالص منفی در نتیجه افت کربنی از برگ‌ها و ساقه‌ها در این مرحله می‌باشد.

در پژوهش Gerreidenbach & Horst (2002) گزارش شد که کاربرد کودهای نیتروژن باعث افزایش طول ریشه و تراکم آن شده و هم چنین ریشه‌های فراوان‌تری در اوایل فصل رشد تشکیل می‌شود. این افزایش طول ریشه و تعداد ریشه شاید از طریق افزایش شاخص سطح برگ و انتقال مواد فتوستتوزی بیشتر برای رشد ریشه‌ها در اوایل فصل رشد گیاه باشد. با توجه به نتایج به دست آمده مصرف کود نیتروژن در مرحله ساقه‌دهی می‌تواند تاثیر بسزایی در افزایش عملکرد گندم داشته باشد. زمانی که نیتروژن در دسترس گیاهان کم می‌شود آن‌ها مجموعه‌ای از پاسخ‌های مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی به نام تغذیه نیتروژنی را فعال می‌کنند. جنبه چشم‌گیر این پاسخ، افزایش رشد و تکثیر ریشه، به ویژه در مناطق غنی NO_3 است (Bouguyon et al., 2015). از نقطه نظر فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی افزایش بیان ژن NRT1.1^2 که کد کننده پروتئین NRT1.1 می‌باشد و به عنوان یک ترانسپورتور^۳ (یک پروتئین با عملکردهای انتقال سنجش) دوگانه شناخته شده است (Gojon, 2011). ترجمه بعد از بیان NRT1.1 از طریق فسفریلاسیون موجب حساسیت این انتقال دهنده به طیف وسیعی از NO_3 محیط می‌شود به گونه‌ای

²nitrate transporter 1.1³Transceptor

که NO_3 خارجی را حس کرده و فعالیت خود را تغییر می‌دهد (Medici & Krouk, 2014., Brien et al., 2016). نتایج این پژوهش مبنی بر تفاوت بیان این ژن در ارقام مختلف با نتایج Duan et al. (2016) مطابقت داشت.

نتیجه‌گیری: بررسی صفات مورد مطالعه در تیمار ۱۵۰ کیلوگرم کود اوره در هکتار در ارقام مورد بررسی نشان داد که اثر

متقابل کود در طول ساقه، طول سنبله، تعداد سنبلچه و تعداد دانه در سنبله در بین ارقام مورد بررسی معنی‌دار نمی‌باشد. در بین تیمارهای مورد بررسی، رقم مروارید تیمار شده با کود اوره بیشترین طول ساقه و بیشترین تعداد سنبلچه و لاین N8019 بیشترین طول سنبله و هر دو ژنوتیپ تیمار شده با کود اوره بیشترین تعداد دانه در سنبله را داشتند. طبق نتایج بدست آمده در این مطالعه، بیان ژن نیتрат ردوکتاز در رقم مروارید تیمار شده با کود اوره نسبت به شاهد (بدون کود اوره) در هر سه مرحله نمونه‌گیری افزایش یافت به طوری که در اولین مرحله نمونه‌گیری (یک روز بعد از کود سرک) بیشترین افزایش را داشت. اما در لاین N8019 بیان ژن نیترات ردوکتاز در اولین مرحله نمونه‌گیری افزایش و در مراحل بعدی کاهش یافت. این نتایج بیانگر این مطلب است که در مرحله اول نمونه‌گیری مقدار نیترات در داخل گیاه کم بوده است، و عرضه نیترات باعث شده است پروتئین ۳-۳-۱۴ از ژن NR جدا شده دفسفوریلاسیون رخ دهد و ژن نیترات ردوکتاز فعال گردد. با گذشت زمان در مراحل بعدی نمونه‌گیری مقدار نیترات در داخل گیاه افزایش می‌یابد، وقتی نیترات داخل گیاه بالا است در سطح مولکولی نیترات ردوکتاز می‌تواند در قسمت سرین باقیمانده فسفریله شود، و یک محل اتصال با پروتئین ۳-۳-۱۴ ایجاد کند. با اتصال پروتئین ۳-۳-۱۴ به آنزیم NR فسفوریلاسیون رخ می‌دهد و فعالیت NR کاهش می‌یابد

سپاسگزاری: از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان به خاطر حمایت مالی و همکاری

در اجرای پژوهش حاضر سپاسگزاری می‌شود.

منابع

- جعفری احمدآبادی سید علی اصغر، عسکری‌همت حشمت‌اله، محمدآبادی محمدرضا (۱۴۰۲). تاثیر شاهدانه بر بیان ژن DLK1 در بافت قلب بره‌های کرمانی. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۵(۱)، ۲۱۷-۲۳۴.
- خاندانی شکوفه، میرفخرایی سیدرضاقلی، محمدینژاد قاسم، ساردوئینسب سمیه (۱۴۰۳). رزیابی تنوع ژنتیکی و بررسی ساختار جمعیت با استفاده از نشانگر SNP در شرایط تنش سرمای دیررس بهاره در گندم نان (*Triticum aestivum* L.). *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۶(۱)، ۱۹-۴۴.
- شکری سمیرا، خضری امین، محمدآبادی محمدرضا، خیرالدین حمید (۱۴۰۲). بررسی بیان ژن MYH7 در بافت‌های ران، دست و راسته بره‌های پرواری نژاد کرمانی، *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۵(۲)، ۲۱۷-۲۳۶.

محمدآبادی محمدرضا، گلکار افروز، عسکری حسنی مجید (۱۴۰۲). اثر رازیانه (*Foeniculum vulgare*) بر بیان ژن فاکتور ۱ رشد شبه انسولین در بافت شکمبه گوسفند کرمانی. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۵(۴)، ۲۳۹-۲۵۶.

References

- Bänziger, M., Feil, B., & Stamp, P. (1994). Competition between nitrogen accumulation and grain growth for carbohydrates during grain filling of wheat. *Crop science*, 34(2), 440-446. <https://doi.org/10.2135/cropsci1994.0011183X003400020025x>.
- Barazandeh, A., Mohammadabadi, M. R., Ghaderi-Zefrehei, M., & Nezamabadipour, H. (2016a). Predicting CpG islands and their relationship with genomic feature in cattle by hidden markov model algorithm. *Iranian Journal of Applied Animal Science*, 6(3), 571-579. <https://sanad.iau.ir/en/Article/1023987?FullText=FullText>
- Barazandeh, A., Mohammadabadi, M. R., Ghaderi-Zefrehei, M., & Nezamabadi-Pour, H. (2016b). Genome-wide analysis of CpG islands in some livestock genomes and their relationship with genomic features Original Paper. *Czech Journal of Animal Science*, 61(11). <https://doi.org/10.17221/78/2015-CJAS>.
- Behera, B. C., Singdevsachan, S. K., Mishra, R. R., Dutta, S. K., & Thatoi, H. N. (2014). Diversity, mechanism and biotechnology of phosphate solubilising microorganism in mangrove—a review. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3(2), 97-110. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2013.09.008>Get rights and content.
- Bordbar, F., Mohammadabadi, M., Jensen, J., Xu, L., Li, J., & Zhang, L. (2022). Identification of candidate genes regulating carcass depth and hind leg circumference in simmental beef cattle using Illumina Bovine Beadchip and next-generation sequencing analyses. *Animals*, 12(9), 1103. <https://doi.org/10.3390/ani12091103>.
- Boswell, F. C., Meisinger, J. J., & Case, N. L. (1985). Production, marketing, and use of nitrogen fertilizers. *Fertilizer technology and use*, 229-292. <https://doi.org/10.2136/1985.fertilizertechnology.c7>.
- Bouguyon, É., Brun, F., Meynard, D., Kubeš, M., Pervent, M., Leran, S., ... & Gojon, A. (2015). Multiple mechanisms of nitrate sensing by Arabidopsis nitrate transceptor NRT1. 1. *Nature plants*, 1(3), 1-8. <https://doi.org/10.1038/nplants.2015.15>
- Bustin, S. A. (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of molecular endocrinology*, 25(2), 169-193. <https://doi.org/10.1677/jme.0.0250169>.
- Cassman, K. G., Bryant, D. C., Fulton, A. E., & Jackson, L. F. (1992). Nitrogen supply effects on partitioning of dry matter and nitrogen to grain of irrigated wheat. *Crop science*, 32(5), 1251-1258. <https://doi.org/10.2135/cropsci1992.0011183X003200050038x>.

- Chen, B. M., Wang, Z. H., Li, S. X., Wang, G. X., Song, H. X., & Wang, X. N. (2004). Effects of nitrate supply on plant growth, nitrate accumulation, metabolic nitrate concentration and nitrate reductase activity in three leafy vegetables. *Plant Science*, 167(3), 635-643. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2004.05.015>.
- Duan, J., Tian, H., & Gao, Y. (2016). Expression of nitrogen transporter genes in roots of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) in response to soil drought with contrasting nitrogen supplies. *Crop and Pasture Science*, 67(2), 128-136. <https://doi.org/10.1071/CP15152>.
- Faure, J. D., Vincentz, M., Kronenberger, J., & Caboche, M. (1991). Co-regulated expression of nitrate and nitrite reductases. *The Plant Journal*, 1(1), 107-113. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.1991.00107.x>.
- Frederick, J. R., & Camberato, J. J. (1995). Water and nitrogen effects on winter wheat in the southeastern Coastal Plain: I. Grain yield and kernel traits. *Agronomy Journal*, 87(3), 521-526. <https://doi.org/10.2134/agronj1995.00021962008700030021x>.
- Galeeva, E. I., Trifonova, T. V., Ponomareva, A. A., Viktorova, L. V., & Minibayeva, F. V. (2012). Nitrate reductase from *Triticum aestivum* leaves: Regulation of activity and possible role in production of nitric oxide. *Biochemistry (Moscow)*, 77, 404-410. <https://doi.org/10.1134/S0006297912040128>
- Gerreidenbach, W.A., & Horst, W.J. (2002). Nitrate-uptake capacity of different root zone of *zea mays* (L.) in vitro and situ. *Plant and Soil*, 196, 295-300. <https://doi.org/10.1023/A:1004280225323>
- Glaab, J., & Kaiser, W. M. (1995). Inactivation of nitrate reductase involves NR-protein phosphorylation and subsequent 'binding' of an inhibitor protein. *Planta*, 195, 514-518. <https://doi.org/10.1007/BF00195708>
- Hosseini, M., Saidi, A., Maali-Amiri, R., Abbasi, A., & Khosravi-Nejad, F. (2021). Developmental regulation and metabolic changes of RILs of crosses between spring and winter wheat during low temperature acclimation. *Environmental and Experimental Botany*, 182, 104299. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2020.104299>.
- Huber, J. L., Huber, S. C., Campbell, W. H., & Redinbaugh, M. G. (1992). Reversible light/dark modulation of spinach leaf nitrate reductase activity involves protein phosphorylation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 296(1), 58-65. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(92\)90544-7](https://doi.org/10.1016/0003-9861(92)90544-7).
- Jafari Ahmadabadi, S. A. A., Askari-Hemmat, H., Mohammadabadi, M., Asadi Fouzi, M., & Mansouri, M. (2023). The effect of Cannabis seed on DLK1 gene expression in heart tissue of Kermani lambs. *Agricultural Biotechnology Journal*, 15(1), 217-234. <https://doi.org/10.22103/jab.2023.21265.1471>.

- Ji, H., Xiao, L., Xia, Y., Song, H., Liu, B., Tang, L., ... & Liu, L. (2017). Effects of jointing and booting low temperature stresses on grain yield and yield components in wheat. *Agricultural and Forest Meteorology*, 243, 33-42. <https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2017.04.016>.
- Karrou, M., & Maranville, J. W. (1994). Response of wheat cultivars to different soil nitrogen and moisture regimes: I. Dry matter partitioning and root growth. *Journal of plant nutrition*, 17(5), 729-744. <https://doi.org/10.1080/01904169409364763>.
- Khandani, S. , Mirfakhraee, R. G. , Mohammadi Nejad, G. and Sardouei-Nasab, S. (2024). Evaluation of genetic diversity and investigation of population structure using SNP markers under late spring cold stress in bread wheat (*Triticum aestivum* L). *Agricultural Biotechnology Journal*, 16(1), 19-44. <https://doi.org/10.22103/jab.2023.21960.1501>
- LaBrie, S. T., & Crawford, N. M. (1994). A glycine to aspartic acid change in the MoCo domain of nitrate reductase reduces both activity and phosphorylation levels in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry*, 269(20), 14497-14501. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)36650-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)36650-4)
- Leleu, O., & Vuylsteker, C. (2004). Unusual regulatory nitrate reductase activity in cotyledons of *Brassica napus* seedlings: enhancement of nitrate reductase activity by ammonium supply. *Journal of Experimental Botany*, 55(398), 815-823. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh088>.
- Medici, A., & Krouk, G. (2014). The primary nitrate response: a multifaceted signalling pathway. *Journal of experimental botany*, 65(19), 5567-5576. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru245>.
- Millner, J. P., Aver, R. V., & Hardacre, A. K. (2005). The yield and nutritive value of maize hybrids grown for silage. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 48(1), 101-108. <https://doi.org/10.1080/00288233.2005.9513637>.
- Mohammadabadi, M., Golkar, A., Askari Hesni, M., & Khezri, A. (2023). The effect of fennel (*Foeniculum vulgare*) on insulin-like growth factor 1 gene expression in the rumen tissue of Kermani sheep. *Agric Biotechnol J*, 15(4), 239-256. <https://doi.org/10.22103/jab.2023.22647.1530>.
- Mohammadinejad, F., Mohammadabadi, M., Roudbari, Z., & Sadkowski, T. (2022). Identification of key genes and biological pathways associated with skeletal muscle maturation and hypertrophy in *Bos taurus*, *Ovis aries*, and *Sus scrofa*. *Animals*, 12(24), 3471. <https://doi.org/10.3390/ani12243471>.
- Moloudi, F., Navabpour, S., Soltanloo, H., Ramazanpour, S. S., & Sadeghipour, H. (2013). Catalase and Metallothionein genes expression analysis in wheat cultivars under drought

- stress condition. *Journal of Plant Molecular Breeding*, 1(2), 54-68. <https://doi.org/10.22058/jpmb.2013.3262>.
- Mosanaei, H., Ajamnorozi, H., Dadashi, M. R., Faraji, A., & Pessarakli, M. (2017). Improvement effect of nitrogen fertilizer and plant density on wheat (*Triticum aestivum* L.) seed deterioration and yield. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 29(11), 899-910. <https://doi.org/10.9755/ejfa.2017.v29.i11.1500>.
- Mosavian, S. N., Akbari, N., Eisvand, H. R., Ismaili, A., & Moshatati, A. (2020). Effect of different nitrogen and zinc levels on grain yield and yield components of wheat (*Triticum aestivum* L.) cv. Chamran under late season heat stress conditions in Ahvaz. *Plant Physiology*, 46, 25-44. <http://cpj.ahvaz.iau.ir/article-1-1291-en.html>
- Navabpour, S., Yamchi, A., Bagherikia, S., & Kafi, H. (2020). Lead-induced oxidative stress and role of antioxidant defense in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Physiology and molecular biology of plants*, 26, 793-802. <https://doi.org/10.1007/s12298-020-00777-3>.
- Noori, M., Sobhkhizi, A., Adibian, M., Keykha, M., & Rigi, K. (2014). Effects of mycorrhiza and nitrogen fertilizer on dry weight, protein percent, harvest index, grain yield in wheat. *International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences* 4(2), 155-159. <https://www.fortunejournals.com/ijpaes/volume-4-issue-2.php>
- O'Brien, J. A., Vega, A., Bouguyon, E., Krouk, G., Gojon, A., Coruzzi, G., & Gutiérrez, R. A. (2016). Nitrate transport, sensing, and responses in plants. *Molecular plant*, 9(6), 837-856. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molp.2016.05.004>.
- Reda, M., Migocka, M., & Kłobus, G. (2011). Effect of short-term salinity on the nitrate reductase activity in cucumber roots. *Plant Science*, 180(6), 783-788. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2011.02.006>.
- Safaei, S. M. H., Dadpasand, M., Mohammadabadi, M., Atashi, H., Stavetska, R., Klopenko, N., & Kalashnyk, O. (2022). An origanum majorana leaf diet influences myogenin gene expression, performance, and carcass characteristics in lambs. *Animals*, 13(1), 14. <https://doi.org/10.3390/ani13010014>.
- Shahsavari, M., Mohammadabadi, M., Khezri, A., Asadi Fozzi, M., Babenko, O., Kalashnyk, O., & Tkachenko, S. (2023). Correlation between insulin-like growth factor 1 gene expression and fennel (*Foeniculum vulgare*) seed powder consumption in muscle of sheep. *Animal Biotechnology*, 34(4), 882-892. <https://doi.org/10.1080/10495398.2021.2000997>.
- Shahsavari, M., Mohammadabadi, M., Khezri, A., Borshch, O., Babenko, O., Kalashnyk, O., ... & Kondratiuk, V. (2022). Effect of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed powder consumption on insulin-like growth factor 1 gene expression in the liver tissue of growing lambs. *Gene Expression*, 21(2), 21-26. <https://doi.org/10.14218/GE.2022.00017>.

- Shokri, S., Khezri, A., Mohammadabadi, M., & Kheyroodin, H. (2023). The expression of MYH7 gene in femur, humeral muscle and back muscle tissues of fattening lambs of the Kermani breed. <https://doi.org/10.22103/jab.2023.21524.1486>.
- Sopher, C. R., Król, M., Huner, N. P., Moore, A. E., & Fletcher, R. A. (1999). Chloroplastic changes associated with paclobutrazol-induced stress protection in maize seedlings. *Canadian Journal of Botany*, 77(2), 279-290. <https://doi.org/10.1139/b98-236>.
- Vidal, E. A., Araus, V., Lu, C., Parry, G., Green, P. J., Coruzzi, G. M., & Gutiérrez, R. A. (2010). Nitrate-responsive miR393/AFB3 regulatory module controls root system architecture in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(9), 4477-4482. <https://doi.org/10.1073/pnas.0909571107>.
- Yang, X. Y., Wang X. F., Wei, M., Yang F. J., & Shi Q. H. (2010). Changes of nitrate reductase activity in cucumber seedlings in response to nitrate stress. *Agricultural Sciences in China*, 9(2), 216-222. [https://doi.org/10.1016/S1671-2927\(09\)60086-9](https://doi.org/10.1016/S1671-2927(09)60086-9)